

貝類の呈味成分について

— クロマトグラフィーによる有機酸の定量 —

Palatable Components of Shellfishes

Determination of Organic Acids by Chromatography

木 倉 綾 子

Ayako Kikura

関 根 和 代

Kazuyo Sekine

本 多 弘 実

Hiromi Honda

柴 沼 忠 三

Chūzō Shibamura

We have studied the organic acids in eight varieties of commercial shellfishes. The sample solution extracted by 80% ethanol was treated with ion exchange resins in order to isolate organic acids. The isolated organic acids were analysed by using silica gel column chromatography and gas chromatography.

The amount of succinic acid which has been considered to be one of the most important taste ingredients in edible shellfishes, was determined by column chromatography, as follows: in short necked clam 111mg%, in oyster 99mg%, in corb shell 152mg%, in hard clam 82mg%, and in bateira 61mg%. In the case of the tokobushi, scallop and ark shell, the calculated amount of succinic acid was found to be about 30mg%.

As for the peaks on the gas chromatograms, citric, malic and lactic acid etc. were detected in minor amounts.

1 緒 言

貝類は古くから食生活に大きな役割を果たして来た。それは各地に貝塚が存在した事によっても明らかである。特に日本料理においては四季折折に使用頻度が高く食膳を潤している。その貝類の呈味成分について古くは青木¹⁾により貝柱の如く肉そのものの味の美味なるもの、あるいはしじみ、あさり、はまぐりの如く煮汁に旨味のあるものにコハク酸が比較的多量に含まれており、コハク酸が重要な呈味成分であると報告している。高木²⁾らはコハク酸が貝類の味を支配するとは考えられないと述べ、長田^{3)~5)}らはあさり生肉より有機酸を9種類分離定量し、コハク酸は有機酸組成の76%を占めていると報告した。更に季節による有機酸の変化および筋肉と内臓部の貯蔵中における変化を分析している。鴻巣⁶⁾らは新鮮なあさり生肉のコハク酸含有量は時間経過にともない徐々に増加し続け、20時間後には2倍になり、56時間で3倍以上に達し貝類におけるコハク酸の呈味成分としての意義について再検討する必要性を認めている。福場⁷⁾らは貝類のコハク酸含有量は試料の鮮度、季節などによる変化の他に従来の定量法にも一つの原因があり、試料の調製法について検討し、アルコール抽出物について水蒸気蒸留により揮発性物質を除いた後、エーテル抽出を行ない定量妨害物質を除いたものを試料液とすることが必要であると述べている。

著者らは貝類の呈味成分について基礎的知見を得る端緒として、イオン交換樹脂クロマトグラフィーにより有機酸試料を単離し、従来からの分析方法によるシリカゲルクロマトグラフィーで分離定量した。更にガスクロマトグラフィーにより有機酸組成を検索し、コハク酸の定量を試みた。

2 実験方法

1) 供試材料

あさり (*Tapes Japonica*) , はまぐり (*Meretrix Iusoria*) , あかがい (*Anadara Brougthonii*) , かき (*Crassostrea Gigas*) , はたて貝 (*Patinopecten Yessoensis*) , ばていら (*Omphalius Pfeifferi*) , とこぶし (*Sulculus Diversicolor Aquatilis*) , しじみ (*Corbicula Ieana*) の市販新鮮品を殻付きで購入し、試料とした。

2) 試料の一般成分の分析

各試料は常法⁸⁾に従い、水分、粗蛋白質、粗脂肪、粗灰分を定量した。グリコーゲン⁹⁾は還元糖を定量し、その値に0.9を乗じて算出した。

3) 有機酸試料の調製

i) エタノール抽出

貝のむき身各々50gを秤取し, 80%エチルアルコールを450 ml加え, $N/2$ 一硫酸を用いて pH 2.0 に調整した後環流冷却器を接続し, 1時間沸騰させてアルコール可溶成分を抽出した。抽出液を $N/2$ 一水酸化ナトリウムを用いて pH 9.0 に調整して減圧濃縮し, 3,000 r.p.m. 20分間遠心分離の後上澄液を50mlに定容した。

ii) イオン交換樹脂による有機酸の単離

エタノール抽出試料10mlを柴沼¹⁰⁾の方法に従い, Amberlite 1R-120-B (45~100mesh) および Amberlite 1RA-400 (24~45 mesh) を通した後, 1N-炭酸アンモニウムで溶離し, 減圧下40℃以下でアンモニア臭がなくなるまで濃縮した。濃縮液は1R-120-Bのカラムを通して遊離酸とし, 減圧濃縮した後真空乾固した。なおガスクロマトグラフィー試料は共通すり合わせ試験管 (30 × 100 mm) に濃縮乾固した。

4) 有機酸のシリカゲルクロマトグラフィー

既往¹¹⁾に従いシリカゲル (和光純薬株式会社製 C-300) を用い, カラムを調製して有機酸試料をスポットし, 5%ブタノール-クロロホルムからブタノールの比の高い混液をカラムに順次に流し有機酸を溶出した。溶出画分はフェノールレッドを指示薬として $N/100$ 一水酸化ナトリウムで中和滴定した。

5) 有機酸のガスクロマトグラフィー (G. C.)

G. C. 装置および分析条件はTable 1に示すごとくである。標準品有機酸を山下¹²⁾の方法に従い, 著者ら¹¹⁾が報告した硫酸とブタノールを用いてエステル化した。又 B.S.A. (Bis trimethylsilyl Acetamid. Pierce Chemical Company 製) シリル化剤により誘導体とし, 分離を試みた。¹³⁾コハク酸ブチルエステルの検量線は内部標準物質として0.6% n-ドデカンのヘキサン液1mlを含むようにエステル濃度を変えて各々10mlに定容し, その4μlずつを3回G.C. につけ内部標準に対する高さの比の平均値を求め作成した。貝類から調製した有機酸試料はブチルエステル化法により分離した。

Table 1. G. C. Instrument and Operating Conditions

Instrument	Shimadzu G. C. - 7 Aprf
Detector	F I D
Column	2.1 m × 3 mm i. d. Glass column
Packing wt % support	Silicone GE SE - 30 5% chromosorb W (AW-DMCS)
Mesh	80 ~ 100
Injection temp.	240 °C
Column oven temp.	80 ~ 200 °C at 3 °C/min starting from 4 min after injection
Carrier Gas (N ₂)	50 ml/min
Inlet press	1.5 kg/cm ²
Hydrogen Gas	0.5 kg/cm ²
Air	0.5 kg/cm ²
Range	10 ³
Attenuation	4
Chart speed	5 mm/min

3 結果および考察

1) 一般成分の分析

一般成分の分析結果はTable 2. に示すごとくである。

Table 2. The Chemical Constituents of Various Shellfishes (%)

Species	Date of fishing	Moisture	Protein	Fat	Ash	Glycogen
Short necked clam	Apr. 18	79.83	12.16	1.11	2.72	1.02
Ark shell	May. 22	80.60	14.54	0.34	1.34	2.44
Oyster	Apr. 30	74.88	10.07	3.72	1.28	4.50
Corb shell	Apr. 18	84.35	9.64	1.23	1.03	1.43
Scallop	May. 8	79.22	15.55	0.33	1.43	1.60
Bateira	July. 17	76.28	19.01	0.35	1.77	1.44
Hard clam	May. 1	83.28	9.79	0.90	1.90	1.43
Tokobushi	June. 30	75.06	18.36	0.37	1.55	1.70

i) 貝類の水分は食品成分表によると80%前後であり、水分含有量が高く、固形物が少ない。²⁾高木らは各種貝類について一般成分を分析し、あさりについては1, 3, 6, 9, 11月の各月の試料について定量した結果、1月の試料は水分含有量が最も高く83.00%であり、11月の試料の水分含有量は78.80%とやや低い値を示した。⁴⁾長田は1~12各月ごとにあさりの水分を測定し、1月の試料の水分含有量が最も高く87.2%であり、4, 8月の試料は各々76.0, 76.6%でその差は10%以上であった。本実験に用いたあさりの水分含有量は79.83%であり、⁴⁾長田の月別により水分含有量が変化した事から推察し、試料購入時期が4月であるからやや低い水分含有量を示したのであろう。はまぐりの水分含有量は高木らの²⁾結果とはほぼ一致したが、かきの水分含有量がやや低い値を示した。

ii) 粗蛋白質について高木らは²⁾あさり12.26~15.00%, かき8.20~8.75%であり、本実験結果を比較すると、はまぐりがやや低い値を示したが、その他の試料はやや高い値を示した。8種類の貝類では、ばていら、とこぶしの粗蛋白質含有量が比較的高い値を示し、次いではたて貝、あかがいであった。

iii) 粗脂肪およびグリコーゲン²⁾は8種類の試料なかきに多く含有した。高木らのかきの粗脂肪の定量値が0.53~0.90%であり低い値を示したが、現在のかきはほとんど養殖されたものであり種類の差異によるものと考えられる。

iv) 粗灰分はあさに含有量が高く2.72%であり、しじみに少なかった。

2) 貝類有機酸のシリカゲルクロマトグラフィー

シリカゲルクロマトグラフィーによるあさりのクロマトグラムはFig 1. に示すようであり主なる3つのピークが認められた。ピーク(1)はコハク酸、ピーク(2)はリンゴ酸、ピーク(3)はクエン

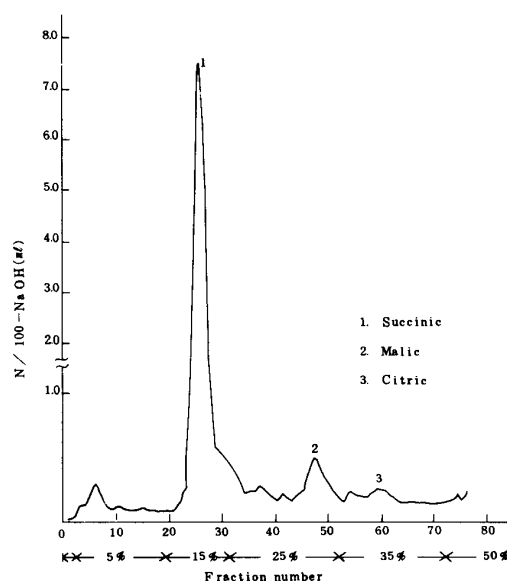


Fig. 1. Column chromatogram of organic acids from short meeked clam

酸と推定した。その他の貝類についてもほぼ同様なパターンにあるクロマトグラムを得た。各貝類のコハク酸、リンゴ酸、クエン酸に相当するピークから算出した含有量はTable 3. に示す

Table 3. The Contents of Organic Acids in the Extracts of Shellfishes by Column Chromatography (mg%)

Species	Organic acid		
	Succinic	Malic	Citric
Short necked clam	111	(22)	(17)
Ark shell	29	12	(12)
Oyster	99	17	23
Corb shell	152	(12)	—
Scallop Adductor muscle	29	8	(5)
Mantle	14	10	(6)
Bateira	61	10	1
Hard clam	82	16	9
Tokobushi	33	10	8

() un detected by G.C.

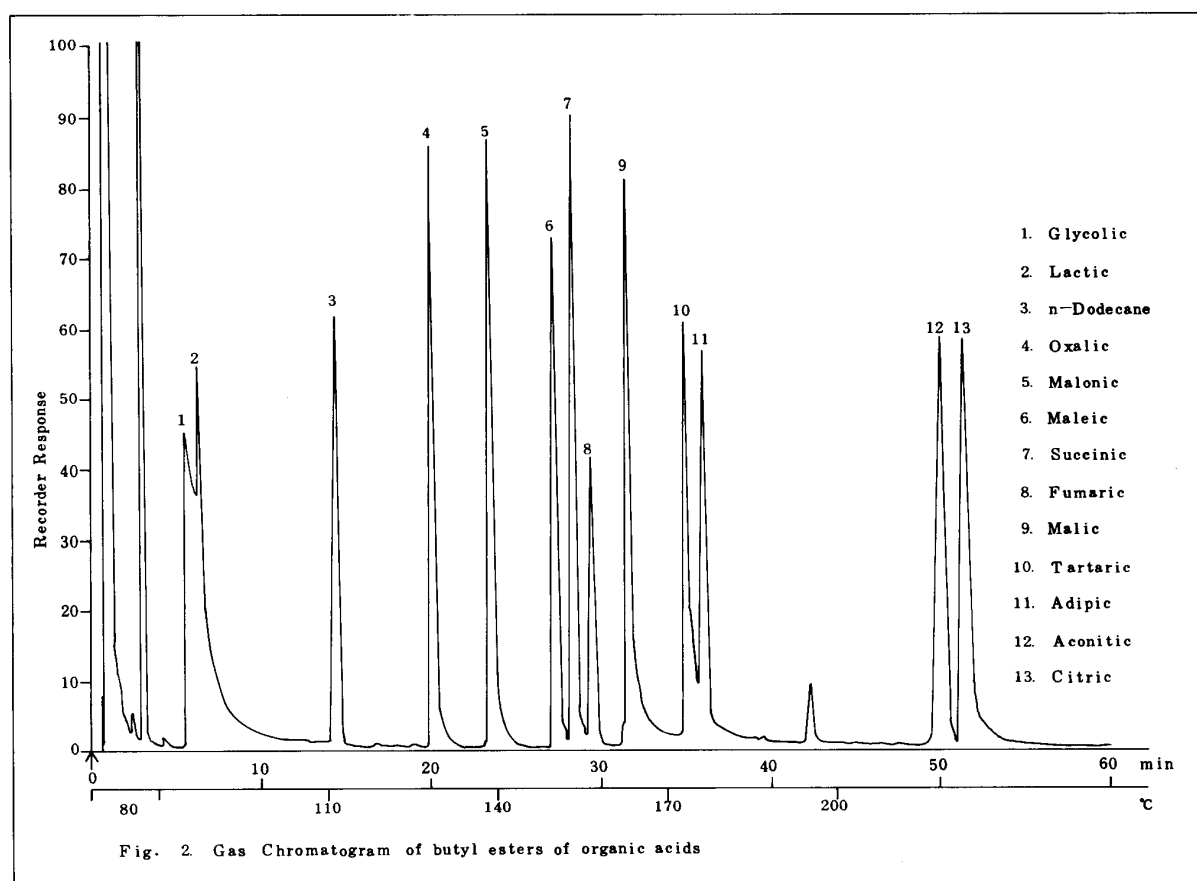
ごとくでありコハク酸はしじみ、あさり、かきに比較的多く含有した。次いではまぐり、ばてい
らであり、あかがい、とこぶし、はたて貝に少なかった。青木¹⁾はあさにコハク酸が330 mg%,
しじみに411 mg%のごとく含有量がかかなり高い値を示し、高木²⁾らはエーテル可溶酸をコハク酸と
して算出し、あさり230~295 mg%, しじみ302 mg%, かき114~150 mg%と報告した。福場⁷⁾
らはエーテル可溶酸を滴定法および細管式電気泳動法により定量し、前者の方法では定量値が高か
った事により、コハク酸以外のエーテル可溶酸が含まれていると報告していることから推察し、
エーテル可溶酸を滴定法によりコハク酸として算出することは望ましくないと考えられる。鴻巣¹⁵⁾
らはイオン交換樹脂(Dowex 50, Duolite A 4)により有機酸試料を調製し、シリカゲルクロ
マトグラフィーで分離定量した結果、あさりのコハク酸含有量が35.5 mg%とかなり低い値を示
した。文献には生むき身からの抽出操作法のpH調整についてふれていないが、宇井¹⁶⁾は、しじみ、
あかがいについてむき身からの抽出操作をpH調整およびpH調整なしで試料を調製し、90時間
エーテル抽出を行ない、シリカゲルクロマトグラフィーで分離定量した結果、pH調整試料はpH
調整なし試料の2.5~3.0倍高い値を示した事から推察し、鴻巣¹⁵⁾らの定量値が低い値を示したのは生
試料からの抽出操作法により差異が生じたのではないであろうか。鴻巣⁶⁾らが報告した他の実験結
果によれば市販品あさりのコハク酸含有量は80 mg%, しじみ128 mg%であり、福場⁷⁾らの細管式電

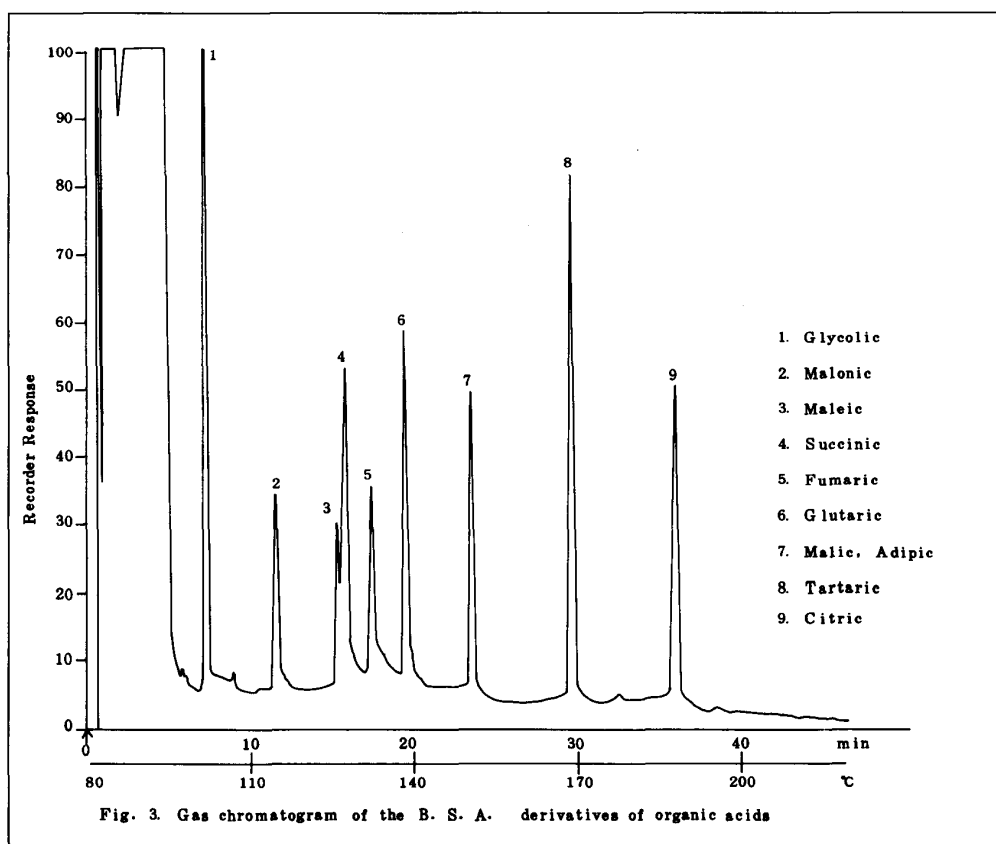
気泳動法による定量値、本実験の定量値共にほぼ近似しており、それぞれの定量値の差は天然物である貝試料そのものの差と推察する。リンゴ酸と想定したピークから算出した値はあまり、かき、はまぐりに微量ではあるが他の貝より多く、クエン酸はかきにわずかに多く含有され、しじみからは分離されなかったが、シリカゲルクロマトグラムのピークがシャープでないために各有機酸の分離に明瞭をかく恐れがあり、断定しがたい。長田⁴⁾、鴻巣⁶⁾らもあまりについてリンゴ酸を定量したが、コハク酸に比較してかなり低い傾向を示している点で一致した。長田⁴⁾はあまりの有機酸をエーテル抽出時間 120 時間により 9 種類分離定量している。成書¹⁷⁾によると抽出時間が長ければ通常エーテル不溶酸もかなり抽出されるとあり、数多くの有機酸が分離されたのであろう。更にシリカゲルクロマトグラフィーに用いた展開溶媒の濃度および展開量のちがいによるものとも考えられる。

3) ガスクロマトグラフィー

i) 標準品有機酸について

各標準品有機酸をブチルエステル化し、Table 1. の測定条件により分離したクロマトグラムおよび B.S.A. 誘導体を分離したクロマトグラムを Fig. 2. 3. に示す。著者ら¹¹⁾がこれまでに





有機酸分析に用いた充填剤Reoplex 400は、低温部分に分離されるグリコール酸，乳酸はシャープに分離されるが，コハク酸とフマル酸のピークが重なるので，コハク酸の定量には適当でないと考え，5% Silicone G E S E -30を用いた。B.S.A.誘導体を分離したクロマトグラムのコハク酸とマレイン酸の分離が悪く，リンゴ酸とアジピン酸のピークが重なった。両クロマトグラムにより検討し，貝類有機酸試料はブチルエステル化し分離した。

コハク酸ブチルエステルの検量線を求めた結果は $y = 0.17x + 0.03$ であり，変動係数は濃度の低い方で1.1%，濃度の高い方で0.6%であった。

ii) 貝類の有機酸組成について

前記8種類の試料のうちあさり，かき，あかがい，はたて貝，しじみの有機酸試料についてガスクロマトグラフィーにより分離した。あさりのクロマトグラムはFig 4. に示すようでありコハク酸のピークがシャープに検出された。その他の貝類のクロマトグラムもほぼ同様なパターンであった。各々のクロマトグラムから算出されたコハク酸量および検出された有機酸の種類をTable 4. に示す。5種類の貝類について乳酸，コハク酸が同定された。フマル酸がはたて貝貝柱に検出されず，リンゴ酸はあさり，しじみに分離されなかったが，あさにマロン酸，アジピン酸が，はたて貝のひもにマロン酸，アコニット酸が検出され，かきにはマロン酸，アコニット酸が分離同定された。各貝類のシリカゲルクロマトグラム上にリンゴ酸，クエン酸と想定す

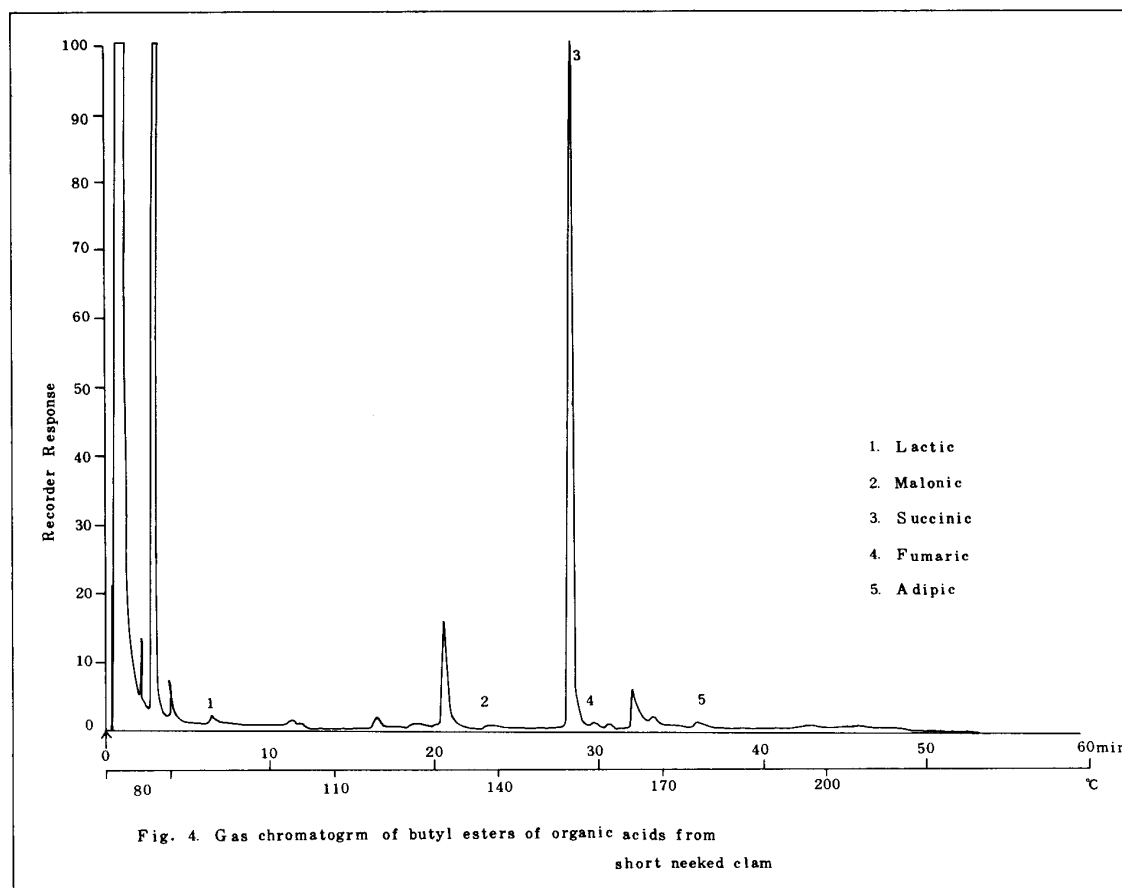


Table 4. Organic Acids in the Extracts of Shellfishes by Gas Chromatography (mg %)

Species	Organic acid							
	Lactic	Malonic	Succinic	Fumaric	Malic	Aconitic	Adipic	Citric
Short necked clam	+	+	105	+	—	—	+	—
Ark shell	+	—	33	+	+	+	—	—
Oyster	+	+	103	+	+	—	—	+
Corb shell	+	—	150	+	—	—	—	—
Scallop Addutor muscle	+	—	6	—	+	—	—	—
Mantle	+	+	5	+	+	+	—	—

+ trace

る分画が微量に算出され、やゝ異なった結果を得たが、ガスクロマトグラフィーにより定量する場合、コハク酸と他の有機酸の含有比がかなり異なる試料については本実験で測定したような条件では検出されなかったものと考え、試料濃度を2段階に調製し分離する必要がある、今後追求したい。

コハク酸含有量はシリカゲルクロマトグラムから算出した値とほぼ近似した結果を得た。ただしほたて貝のコハク酸含有量の差異は同一試料でないためであるが参考とした。貝柱についてアルコール抽出過程のpHを調整しイオン交換樹脂により有機酸試料を調製したものについて両クロマトグラフィーによりコハク酸を定量した値はかなり近似的であることを確認した。

貝8種類の内、あさり、しじみ、かき、はまぐりのコハク酸含有量が比較的高い値を示した事で、青木¹⁾が煮汁に旨味のある貝類にコハク酸が比較的多量に含まれていると報告された事が明らかとなった。しかし、あかがい、ほたて貝、とこぶしにはコハク酸含有量が少なかったが、それぞれ特徴ある味を呈している。貝類中の有機酸についてコハク酸がその大部分を占めている事は確認されたが、その含有量にはかなりの差異があった。

ばていら、とこぶし、あかがい、ほたて貝はコハク酸含有量は少ないが、あさり、しじみ、はまぐり、かきに比較して粗蛋白質がやゝ高い値を示した。高木²⁾らは貝類のエキス窒素を定量し、貝介類の味はグリシン以外のモノアミノ酸に負うところが大きいようにみえると述べ、鴻巣¹⁵⁾らはあさりエキス成分中の遊離のアミノ酸を分析し、トリプトファンを除くすべてのアミノ酸を定量しているように、コハク酸が少ない貝類でもアミノ酸などによる味も加わり特徴のある味を呈するものと推測する。ほたて貝、あかがいなどは貝肉そのもののなめらかさ、とこぶし等は歯ごたえがあり、物理的な味覚により旨さを感じると考えられる。又かきは粗脂肪、グリコーゲンが他の貝に比較して高い値を示したが、それらも呈味を左右する一因であろう。

それぞれの貝にはコハク酸以外の有機酸が微量ではあるが分離された事などを含めて、貝類の呈味成分は、コハク酸を主体とする他の有機酸も含まれた複雑なる酸味を形成していることが推察された。

4 要 約

貝類の呈味成分について基礎的知見を得る端緒として、市販貝類のあさり、かき、はまぐり、ばていら、とこぶし、ほたて貝、あかがい、しじみを選び、試料を常法に従い一般成分を分析した結果、貝類は水分含量が多く固形物が比較的少ない。粗蛋白含有量は8種類の試料ではばていら、とこぶし、ほたて貝、あかがいに多く、かきに粗脂肪、グリコーゲンがやゝ多く含有された。

それぞれの貝類について、シリカゲルクロマトグラフィーにより有機酸を分離定量した結果、

コハク酸、リンゴ酸、クエン酸と想定されるものを検出定量した。ただし、しじみにはクエン酸が検出されなかった。コハク酸含有量はあさり、かき、しじみに比較的多く、次いでまぐり、ばていらであり、あかがい、はたて貝、とこぶしには少なかった。同時にあさり、かき、あかがい、しじみ、はたて貝についてガスクロマトグラフィーを試み、コハク酸、乳酸を分離同定した。フマル酸ははたて貝貝柱に検出されず、リンゴ酸はあさり、しじみに分離されなかった。マロン酸があさり、かき、はたて貝のひもに、アジピン酸があさりに、アコニット酸がはたて貝のひもに分離され、クエン酸はかきのみで分離されたが、コハク酸以外はごく微量であり定量できなかった。コハク酸含有量は両クロマトグラフィーによりほぼ近似した値が得られ、貝類の有機酸の大部分はコハク酸であるが、貝の種類によりその含有量にかなりの差がある事が認められた。

終わりにあたり、ガスクロマトグラフィーについて有益な御助言を賜りました農学博士筑波大学体育科学系（栄養学）鈴木正成助教授、実験に御協力下さった本学食品化学研究室卒論生高島典子、田高佳代子、今橋三帆子、伊東由美子、佐藤可奈の諸氏に謝意を表します。なおこの報告は日本家政学会関東支部57年度例会において発表した。

文 献

- 1) 青木克；農化，8，867（1932），
- 2) 高木一郎，清水亘；日水誌，28，1192（1962）
- 3) 長田博光，岡尾忠活；東洋食品研報，6，54（1964）
- 4) 長田博光；栄養と食糧，19，207（1966）
- 5) 長田博光，後藤郁子；栄養と食糧，20，391（1967）
- 6) 鴻巣博保，柴生田正樹，橋本芳郎；栄養と食糧，20，186（1967）
- 7) 福場博保，津田淑江；栄養と食糧，33，247（1980）
- 8) 林 寛，福澤美喜男，菊野恵一郎，箕口重義；3-3，理工学社（1973）
- 9) 東京大学農芸化学教室；実験農芸化学下巻，624，朝倉書店（1952）
- 10) 柴沼忠三；千葉大園芸特別報告，2，47（1968）
- 11) 木倉綾子，吉川美代子，柴沼忠三；和洋女大紀要，23，53（1982）
- 12) 山下市二，田村太郎，吉川誠次，鈴木重治；分析化学，22，1334（1973）
- 13) 島津アプリケーションニュース；ガスクロマトグラフィー，23（1978）

- 14) 宮地昇, 河野景明; 農化, 27, 465 (1953)
- 15) 鴻巣章二, 藤本健四郎, 高島良子, 松下輝子, 橋本芳郎; 日水誌, 31, 680 (1965)
- 16) 宇井恭子; 和洋女大卒論 (1981)
- 17) 東京大学農芸化学教室; 改訂新版実験農芸化学下巻, 115, 朝倉書店 (1972)